

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2003 年 9 月 25 日 (25.09.2003)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 03/078631 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/12, C07K 14/47, C12Q 1/68, C12N 1/15, 1/19, 1/21, 5/10, C07K 16/18 (74) 代理人: 安富 康男, 外 (YASUTOMI, Yasuo et al.); 〒532-0011 大阪府 大阪市 淀川区西中島 5 丁目 4 番 20 号 中央ビル Osaka (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP03/02620 (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (22) 国際出願日: 2003 年 3 月 6 日 (06.03.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ: 特願2002-71592 2002 年 3 月 15 日 (15.03.2002) JP (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 鐘淵化学工業株式会社 (KANEKA CORPORATION) [JP/JP]; 〒530-8288 大阪府 大阪市 北区中之島 3 丁目 2 番 4 号 Osaka (JP).
- (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 丹羽 英夫 (NIWA, Hideo) [JP/JP]; 〒674-0084 兵庫県 明石市 魚住町西岡 2 5 6 8-3 Hyogo (JP). 山下 憲司 (YAMASHITA, Kenji) [JP/JP]; 〒761-8003 香川県 高松市 神在川窪町 3 3 2-3 Kagawa (JP).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: NOVEL GENES

(54) 発明の名称: 新規遺伝子

(57) Abstract: It is intended to detect and screen proliferative insulin-producing cells and to differentiate and proliferate the insulin-producing cells, precursor cells thereof or cells analogous thereto. Genes expressed specifically in the pancreas of a PHHI patient, which are seemingly spontaneous proliferation models of pancreatic  $\beta$  cells, are detected and, by searching for on a base sequence database, three novel genes are found out. Using these genes, gene products thereof or gene sequences thereof, insulin-producing cells under proliferation can be detected by, for example, Northern analysis or RT-PCR. By transferring these genes into appropriate cells by genetic engineering techniques, moreover, these cells can be differentiated into insulin-producing cells.

(57) 要約: 本発明の目的は、増殖能を有するインスリン産生細胞を検出し選抜すること、さらに、インスリン産生細胞及びその前駆細胞、あるいはそれと類縁の細胞を分化・増殖させることである。本発明は、膵  $\beta$  細胞の自然増殖モデルと考えられる PHHI 患者の膵臓に特異的に発現している遺伝子を検出し、塩基配列データベースを検索したところ、3 種の新規遺伝子を見出したことによる。本発明によれば、これらの遺伝子、遺伝子産物、あるいは遺伝子配列を用いて、たとえば、ノーザン解析や RT-PCR によって増殖しているインスリン産生細胞を検出することができる。また、これらの遺伝子を適当な細胞に遺伝子工学的手法により導入し、インスリン産生細胞に分化させることができる。

BEST AVAILABLE COPY

明細書  
新規遺伝子

技術分野

- 5     本発明は複数の細胞種から構成される組織或いは細胞集団から増殖しているインスリン産生細胞を検出する技術に関わる。また、本発明はインスリン産生細胞である膵  $\beta$  細胞及びその前駆細胞、あるいは膵  $\beta$  細胞と類縁の細胞、たとえば神経細胞等を増殖させる技術に関わる。

10   背景技術

- 膵  $\beta$  細胞は血糖値を降下させる唯一のペプチドホルモンであるインスリンを産生する器官である。何らかの原因により膵  $\beta$  細胞のインスリン産生能が損なわれると血糖値を正常に保つことが不可能となり糖尿病を発症する。インスリン産生能が損なわれた糖尿病患者にインスリン産生能を回復させ、血糖値を正常に  
15   制御するためには、インスリン産生能を有する細胞を移植することが根本的な治療となる。

- インスリン産生細胞の供給源としては死体の膵臓、あるいは近い将来実用化されようとしている胚性幹細胞（ES細胞）または間葉系幹細胞から分化させたインスリン産生能を有する細胞等が考えられる。胚性幹細胞は胚盤胞の内部細胞塊  
20   に由来する細胞でほぼすべての組織、細胞に分化する能力を有している。また、間葉系幹細胞は骨髓、血液、真皮、骨膜等に見出される多分化能を有する細胞である。近年、これらの細胞から、試験管内及び生体内で人為的にインスリン産生細胞や神経細胞、心筋細胞等の機能を有する細胞を分化させることが示されている。しかし、これらの組織あるいは細胞集団は供給に限りがあり糖尿病患者の  
25   治療に十分な細胞数を確保することは困難であると考えられる。そこでインスリン産生細胞あるいはその供給源となる細胞を増殖させることが求められる。

そのような効果を期待できる手法としてHGF（Hepatocyte growth Factor）、Reg蛋白質、ベータセルリン等の細胞分化・増殖因子を供給源となる細胞に作用させることが考えられる（Otonkoskiら、

Diabetes 43巻、947-953頁、1994年、Watanabe  
ら、Proc. Natl. Acad. Sci. 91巻、3589-35  
92頁、1994年、Yamamotoら、Diabetes 49巻、202  
1-2027頁、2000年）が、現在までのところ実際の治療に適用できるよ  
5 うな因子は見出されていない。

また、このような細胞分化・増殖因子を用いてインスリン産生細胞を含む細胞  
集団を増殖させてもその中から真に有効な細胞、すなわち増殖能を有するインス  
リン産生細胞だけを治療に用いることが望まれるが、このような細胞を選抜する  
ための有効な方法は今までのところ明らかにされていない。

10

#### 発明の要約

本発明が解決しようとしている課題は、細胞分化・増殖因子等を用いて治療に  
必要な数のインスリン産生細胞を含む細胞集団から目的の細胞、すなわち増殖能  
を有するインスリン産生細胞を検出する方法、さらにはそれらを選抜するための  
15 方法を提供すること、及び糖尿病等生体が産生する生理活性物質の絶対的不足に  
起因する疾患の治療のためにインスリン産生細胞である膵  $\beta$  細胞、あるいはそ  
れと類縁の細胞、たとえば神経細胞等をより効率的に分化・増殖させる方法を提  
供することにある。

本発明は、PHHI患者の膵臓で特異的に発現している新規な遺伝子、および  
20 その遺伝子から翻訳される蛋白質、そしてその利用法に関する。

本発明の蛋白質は、(1) 配列番号1、2または3で表されるアミノ酸配列か  
らなる蛋白質、または、(2) 配列番号1、2または3で表されるアミノ酸配列  
を有する蛋白質である。

本発明の新規な遺伝子は、(1) 配列番号1、2または3で表されるアミノ酸  
25 配列からなる蛋白質をコードするDNA、(2) 配列番号4、5または6で表さ  
れる塩基配列からなるDNA、(3) 配列番号4の174~904番目の塩基配  
列からなるDNA、配列番号5の79~2115番目の塩基配列からなるDNA  
若しくは配列番号6の28~384番目の塩基配列からなるDNA、または、(4)  
配列番号4、5または6で表される塩基配列の一部からなるDNAであって、

少なくとも、(3)の部分配列領域のDNAの塩基配列を有するDNAである。

本発明の新規な遺伝子及び蛋白質の利用法は、(1)本発明の新規なDNAを用いて、増殖しているインスリン産生細胞を検出する方法、(2)新規なDNAを組み込んだベクターより得られる形質転換体、(3)新規なDNAを、胚性幹細胞または間葉系幹細胞を含む初代培養細胞または樹立細胞株に導入して胚性幹細胞または間葉系幹細胞を分化させる方法、(4)新規なDNAを、胚性幹細胞または間葉系幹細胞を含む初代培養細胞または樹立細胞株に導入して、胚性幹細胞または間葉系幹細胞を増殖させる方法である。(3)の方法、及び(4)の方法においては、胚性幹細胞または間葉系幹細胞が生体の生理機能を有する細胞であることが好ましい。更に、(3)の方法においては、分化した細胞がインスリン産生細胞や神経細胞であることが好ましい。

また、本発明の蛋白質または新規な遺伝子がコードする蛋白質を抗原として認識する抗体もまた、本発明の1つである。

更に、該抗体を用いた疾患の診断法もまた、本発明の1つである。本発明の診断法における目的の疾患としては、細胞増殖性の疾患、膵臓の疾患、神経系の疾患、家族性持続性過インスリン性低血糖症等が挙げられる。

#### 図面の簡単な説明

図1は、家族性持続性過インスリン性低血糖症患者の膵臓に特異的なNC1、NC2及びNC3遺伝子の発現をノーザン解析により調べた結果を示す図である。

図2は、細胞の分化に伴うNC3遺伝子の発現変化をノーザン解析により調べた結果を示す図である。

図3は、NC1遺伝子を強制発現させたPC12細胞の形態変化を示す図である。

#### 発明の詳細な開示

以下に本発明を詳述する。

本発明者らは、増殖しているインスリン産生細胞、または膵β細胞で特異的に発現している遺伝子の検索を行うため、このような遺伝子が発現している可能

性の高い組織として家族性持続性過インスリン性低血糖症 (p e r s i s t e n t h y p e r i n s u l i n e m i c h y p o g l y c e m i a o f i n f a n c y ; P H H I) 患者の膵臓を選んだ。PHHIはnesidioblastosisとも呼ばれるヒトの遺伝性疾患であり、膵β細胞上のカリウムチャンネルの一部に変異があることが知られている。このため、この疾患の患者の膵β細胞は、常にインスリンの分泌が促されている状態になっており、重篤な低血糖症状を呈する (S c i e n c e , 2 6 8 , 4 2 6 ( 1 9 9 5 ) ) 。また、PHHI患者では高い血中インスリン濃度とともにランゲルハンス島、特にβ細胞の過形成が見られるが、これは癌細胞のように形質転換した細胞とは明確に区別される。このため、PHHI患者の膵臓は膵β細胞の自然増殖モデルであるとされている。

したがって、本発明者らは、PHHI患者の膵臓で特異的に発現している遺伝子を同定すれば、それは増殖している膵β細胞を検出するためのマーカーとなり得る上、前駆体の細胞から膵β細胞に分化させるあるいは膵β細胞を増殖させる分子をコードしていることも期待できると考え、PHHI患者の膵臓及び健康人の膵臓からRNAを抽出し、それぞれの組織で発現している遺伝子のcDNAを合成して遺伝子サブトラクションを行い、PHHI患者の膵臓で特異的に発現している新規な遺伝子を取得することに成功した。

すなわち本発明は、PHHI患者の膵臓で特異的に発現している新規な遺伝子、およびその遺伝子から翻訳される蛋白質、そしてその利用法に関する。

本発明のDNAとしては、(1) 配列番号1、2または3で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質をコードするDNA、(2) 配列番号4、5または6で表される塩基配列からなるDNA、(3) 配列番号4の174～904番目の塩基配列からなるDNA、配列番号5の79～2115番目の塩基配列からなるDNAまたは配列番号6の28～384番目の塩基配列からなるDNA。

(4) 配列番号4、5または6で表される塩基配列の一部からなるDNAであって、少なくとも、上記(3)のDNAの塩基配列を有するDNA、が挙げられる。

ここで、(2)の配列番号4、5または6で表される塩基配列からなるDNAはいずれも、本発明において初めて見いだされた新規な遺伝子である。これら新

規な遺伝子は、以下に述べる方法によって取得できた。

PHHI 患者の脾臓及び健常人の脾臓から酸性フェノール法により RNA を抽出し、ポリ A (+) RNA を精製した後、逆転写酵素を用いてそれぞれの組織に由来する cDNA を合成する。これらの cDNA を材料として Hubank と Schatz の方法 (Nucleic Acids Res., 22, 5640 (1993)) により遺伝子サブトラクションを行い、PHHI 患者の脾臓で特異的に発現している遺伝子を検出する。今回、特異的遺伝子の塩基配列を決定し、塩基配列データベースを検索したところ、特異的遺伝子のうち少なくとも 3 種類の遺伝子は新規遺伝子、即ち機能が明らかになっていない遺伝子であることが確認された。

データベース検索により新規遺伝子であることが確認された 3 種類の遺伝子をそれぞれ NC1、NC2、及び NC3 と名づけ、それらの塩基配列を配列番号 4 (NC1)、5 (NC2)、及び 6 (NC3) に示した。また、それらの遺伝子から翻訳されるタンパク質のアミノ酸配列を塩基配列から予測し、配列番号 1 (NC1)、2 (NC2)、及び 3 (NC3) に示した。

本発明においては、上記新規遺伝子の塩基配列の一部分の DNA を用いても、後述する目的に利用できる。ここでいう、一部分の塩基配列を有する DNA とは目的を達することができれば特に限定されるものではないが、具体的には、配列番号 4 の 174～904 番目の塩基配列からなる DNA、配列番号 5 の 79～2115 番目の塩基配列からなる DNA または配列番号 6 の 28～384 番目の塩基配列からなる DNA が挙げられ、また該部分配列領域を含む配列番号 4、5 または 6 の塩基配列の一部分からなる DNA が挙げられる。

本発明の DNA を得る方法は特に限定されず、上記新規遺伝子の取得方法によって得た遺伝子をそのまま、あるいはその一部のみを用いても良いし、該配列を有する DNA を化学合成によって作製しても良い。

本発明の蛋白質としては、(1) 配列番号 1、2 または 3 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質、(2) 配列番号 1、2 または 3 で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質、が挙げられる。これら蛋白質を得る方法は特に限定されないが、例えば、遺伝子工学的に大腸菌、動物細胞等を宿主とし、先の本発明の DNA を

ベクターに組み込んで形質転換し、該形質転換体を培養して得ることができる。  
ここでのベクターへの組み込みや形質転換方法、その培養方法などは、公知の方法を用いることができる。

本発明において、これらのPHHI患者の膵臓で特異的に発現している遺伝子  
5 から由来するDNA、及びそのDNAから翻訳される蛋白質を用いれば、次に述べるような方法で様々な細胞種を含む組織あるいは細胞集団から、増殖しているインスリン産生細胞／膵β細胞を検出し、それを選抜することができる。

目的の組織または細胞集団からRNAを抽出し、特異的遺伝子に由来する本発明のDNAを適当な方法、たとえば放射性同位元素<sup>32</sup>PとDNA修飾酵素を用  
10 いて標識したものをプローブとしてノーザン解析を行う。目的の組織または細胞集団に増殖しているインスリン産生細胞／膵β細胞が存在すればオートラジオグラフィーにより検出される。また、目的の組織または細胞集団から抽出したRNAから合成したcDNAを鋳型として、本発明のDNAをプライマーとして用いてPCRを行うことによっても、増殖しているインスリン産生細胞／膵β細胞  
15 を検出することができる。

また本発明の蛋白質を抗原として認識する抗体を作製し、この抗体を用いて、免疫学的手法、たとえば組織免疫染色により、目的の組織または細胞集団から、増殖しているインスリン産生細胞／膵β細胞を検出することができる。また、この抗体を用いて、インスリン産生細胞／膵β細胞の増殖が関与する疾患を診  
20 断することができる。このような疾患としては、例えば、細胞増殖性の疾患、膵臓の疾患、神経の疾患等が挙げられ、なかでも、上記抗体は家族性持続性過インスリン性低血糖症の診断に好適に用いられる。

また、本発明の遺伝子は膵β細胞の自然増殖モデルであるPHHI患者の膵臓に特異的に発現していることから、膵β細胞或いはそれと類縁の細胞の増殖  
25 または分化に関与していると考えられる。したがって、該遺伝子を由来とする本発明のDNAをインスリン産生細胞／膵β細胞及び、例えば神経細胞等のそれと類縁の細胞の前駆細胞、あるいは前駆細胞に相当する培養細胞、例えば胚性幹細胞や間葉系幹細胞等に導入し、発現させることによりそれらの細胞の増殖を促進させることができると考えられる。また、同様に本発明のDNAをインスリン

産生細胞／膵  $\beta$  細胞及び、例えば神経細胞等のそれと類縁の細胞の前駆細胞、あるいは前駆細胞に相当する培養細胞、例えば胚性幹細胞や間葉系幹細胞等に導入し、発現させることによりそれらの細胞のインスリン産生細胞や神経細胞への分化を誘導させることができると考えられる。これらの胚性幹細胞や間葉系幹細胞は、生体の生理機能を有する細胞であることが好ましい。ここで、生体の生理機能とは、*in vitro*または*in vivo*における高い分化能を意味する。これら導入発現の方法に関しては、通常行われる公知の方法を用いることができる。

#### 10 発明を実施するための最良の形態

以下に実施例をあげて本発明をより具体的に説明するが、その要旨を越えない限り、以下の実施例に限定されるものではない。

##### (実施例1) 新規遺伝子NC1, NC2及びNC3の取得方法

15 PHH I 患者の膵臓及び健常人の膵臓からRNAzol B (パイオテックス・ラボラトリーズ製) を用いて全RNAを抽出し、PolyA Tract messenger RNA isolation system (プロメガ製) によりポリA (+) RNAを精製した。このポリA (+) RNAからRiboclon e cDNA Synthesis System (プロメガ製) を用いて2本鎖cDNAを合成した。PHH I 患者の膵臓由来及び健常人の膵臓由来の2本鎖cDNAをそれぞれ制限酵素DpnII (ニューイングランド・バイオラボ製) で完全切断し、フェノール処理により反応を停止した後、エタノール沈殿により切断したcDNA断片を回収した。回収したDNA断片を滅菌蒸留水に懸濁し、1.2  $\mu$ gのcDNA断片に対して8  $\mu$ gのR-Bgl-24 (a g c a c t c t c c a g c c c t c t c a c c g c a の塩基配列を有するオリゴDNA) と4  $\mu$ gのR-Bgl-12 (g a t c t g c g g t g a) を50  $\mu$ lのスケールでT4 DNAリガーゼ (ニューイングランド・バイオラボ製) を用いて14℃、16時間の反応により結合させた。反応産物のDNA濃度を6  $\mu$ g/mlとなるように調製し、このうち1  $\mu$ l分を分取してR-Bgl-24をプライマーとしてPC



R反応により増幅させた。PHHI患者膵臓由来の増幅産物をテスター、健常人膵臓由来の増幅産物をドライバーと呼ぶ。テスター及びドライバーをDpnIIで切断することによりR-Bgl-24、R-Bgl-12オリゴDNAを除去し、テスターのみに別のオリゴDNA J-Bgl-24 (accgacgtcga  
5 actatccatgaaca)、J-Bgl-12 (gatctgttcatg) を結合させた。オリゴDNAを結合させたテスター0.4μgに対し100  
倍量(40μg)のドライバーを加え、エタノール沈殿させた後4μlのEE×  
3緩衝液[30mM N-(2-hydroxy-ethyl) piperazine-N'-3-propane sulfonic acid (シグマ製)  
10 ; 3mM EDTA (pH8.0)]に懸濁した。このDNA溶液を98℃ 5  
分間の熱処理で変性した後、67℃で20時間保持してアニールさせ、TE緩衝  
液[10mM Trizma Base (シグマ製) ; 1mM EDTA (pH  
8.0)]を加えて400μlとした。このうち10μlを分取し、72℃で3  
分間保持してJ-Bgl-12をcDNAからはずし、5単位のTaqポリメ  
15 ーゼ(ニューイングランド・バイオラボ製)を添加してさらに5分間反応させて  
1本鎖になった部分を2本鎖にした。この反応産物を鋳型として95℃ 1分間  
／70℃ 3分間 10サイクルのPCR反応を行い、増幅産物をフェノール処  
理、エタノール沈殿し、400μlの0.2倍濃度TE緩衝液に懸濁し、40単  
位のMung Bean Nuclease (ニューイングランド・バイオラボ  
20 製)を加え、30℃で35分間反応させた。この反応産物をDP1と呼ぶ。10  
μlのDP1にプライマーとして2μgのJ-Bgl-24を加え、95℃ 1  
分間／70℃ 3分間 18サイクルのPCR反応を行って得られた増幅産物を  
DpnIIで切断し、1.2μgのcDNA断片に対し8μgのN-Bgl-2  
4 (aggcaactgtgctatcgaggga)、4μgのN-Bgl  
25 -12 (gatcttccctcg)を結合し、以下DP1を得た手法に準じて  
DP2を得た。DP2をN-Bgl-24をプライマーとしたPCR反応により  
増幅し、DpnII切断後J-Bgl-24、J-Bgl-12を結合し、同様  
にしてDP3を得た。J-Bgl-24をプライマーとしたPCR反応(95℃  
1分間／70℃ 3分間 22サイクル)によりDP3を増幅し、得られた増

幅産物をDpnIIで切断後、pUC19のBamHI部位にサブクローニングした。得られたクローンの塩基配列を決定し、GenBank等の塩基配列データベースを検索したところ、それらのうち3個のクローンがデータベース上のあらゆる塩基配列と一致しなかった。さらにこれらのクローンをプローブとしてc  
5 DNAライブラリーをスクリーニングし、全長cDNAを得、それぞれNC1、NC2、NC3とした。

(実施例2) ノーザン解析による増殖しているインスリン細胞/膵β細胞の検出

- 10 実施例1で得られたNC1(配列番号4)、NC2(配列番号5)及びNC3(配列番号6)の遺伝子配列の一部分のDNAを用いて、目的の組織中に増殖しているインスリン産生細胞が含まれているか否かをノーザン解析により検討した。
- 健常人の膵臓(レーン1及びレーン2、2検体)及びPHHI患者の膵臓(レーン3、1検体)からTRIzol(ギブコ・ライフテックオリエンタル社製)  
15 を用いて全RNAを抽出し、精製した。これらを1.0%アガロースゲル電気泳動により分画した後、ナイロンメンブラン(ハイボンド-N、アマシャム・ファルマシア社製)にキャピラリー法により転写した。配列番号4の174~904番目の塩基配列からなるDNA、配列番号5の79~2115番目の塩基配列からなるDNA、配列番号6の28~384番目の塩基配列からなるDNAを、そ  
20 れぞれPCR法により増幅し、アガロースゲル電気泳動により分画した後、目的のDNA断片をゲルから切り出し、精製した。これらをT4ポリヌクレオチドキナーゼ(宝酒造製)と $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP(アマシャム・ファルマシア社製)を用いて放射能標識し、ノーザン解析用のプローブとした。RNAを転写したナイロンメンブランと放射能標識したプローブを混合して65℃で1晩ハイブリダイ  
25 ザーションを行った後、メンブランを洗浄し、オートラジオグラフィーによりプローブと反応するRNA分画を検出した(図1)。NC1、NC2及びNC3由来の部分配列のDNAのいずれも、それをプローブとして用いた場合に、PHHI患者由来のRNAからはシグナルが検出されたが、健常人由来のRNAからは検出されなかった。

(実施例3) 細胞の分化に伴うNC3の発現の変化

ラットインシュリノーマから樹立されたRIN-m細胞のインスリン産生能は低い、酪酸ナトリウムを培養系に加えることによりインスリンを高濃度に分泌  
5 するようになり、インスリン産生細胞に分化することが示されている (Bart  
holomeuszら、Endocrinology 24巻、2680-26  
85頁、1989年)。RIN-m細胞を6mMの酪酸ナトリウム存在下で16  
時間培養した後、全RNAを抽出し、配列番号6の28~384番目の塩基配列  
からなるDNAをプローブとして、実施例2に記載したものと同様の方法でノー  
10 ザン解析を行った。その結果、図2のAに示したように、酪酸ナトリウムを加え  
て培養したRIN-m細胞ではNC3遺伝子の発現が亢進していた。

また、副腎褐色細胞腫由来のPC-12細胞は神経成長因子(NGF)を添加  
することにより神経突起を伸展し、神経細胞様に分化することが知られている (Sal  
15 tieiraら、Bioessay 16巻、405-411頁、1994年)  
)。NGFを50ng/mlの濃度になるように加えた培養系で16時間培養し  
たPC-12細胞から全RNAを抽出し、配列番号6の28~384番目の塩基  
配列からなるDNAをプローブとして、同様の方法でノーザン解析を行った。図  
2のBに示したように、NGFを加えて培養したPC-12細胞ではNC3遺伝  
子の発現が亢進していた。

20

(実施例4) NC1遺伝子を強制発現させたPC-12細胞の形態変化

配列番号4に記載されている塩基配列のうち、配列番号1のアミノ酸配列から  
なる蛋白質をコードする領域である174~904番目の塩基配列部分のDNA  
を動物細胞用遺伝子発現ベクターであるpCIneoの所定の部位に組み込み、  
25 NC1遺伝子発現ベクターを構築した。このものをリボソーム法によりPC-1  
2細胞に導入し、強制発現させた。geneticinを500μg/mlの濃  
度で加えた培養系で細胞を維持し、発現ベクターを保持した細胞を選択した。図  
3に示したようにNC1遺伝子を強制発現させたPC-12細胞の中には神経突  
起を伸張させた細胞が観察され、NC1遺伝子の強制発現によりPC-12細胞

を神経細胞様に分化させることができることが示唆された。

#### 産業上の利用の可能性

- 本発明によって見いだされた新規遺伝子は、PHH I 患者の膵臓に特異的に発
- 5 現しているだけでなく、細胞の分化・増殖に伴って発現が変化したり、未分化の細胞に遺伝子工学的手法により強制発現させることにより機能を有する細胞への分化を誘導させうるものである。したがって、これらの遺伝子、及びその一部のDNAやそれらから翻訳される蛋白質を用いて、増殖能を有するインスリン産生細胞を容易に検出し、それらを選抜すること、さらにはインスリン産生細胞を分
- 10 化・増殖させることが可能となる。さらにはインスリン産生細胞である膵  $\beta$  細胞、及びそれと類縁の細胞（たとえば神経細胞等）の分化・増殖の異常に起因する種々の疾患の新たな診断法が開発できる。

## 請求の範囲

1. 配列番号 1、2 または 3 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質。
- 5 2. 配列番号 1、2 または 3 で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質。
3. 配列番号 1、2 または 3 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質をコードする DNA。
- 10 4. 配列番号 4、5 または 6 で表される塩基配列からなる DNA。
5. 配列番号 4 の 174～904 番目の塩基配列からなる DNA、配列番号 5 の 79～2115 番目の塩基配列からなる DNA または配列番号 6 の 28～384 番目の塩基配列からなる DNA。
- 15 6. 配列番号 4、5 または 6 で表される塩基配列の一部からなる DNA であって、少なくとも、請求の範囲第 5 項記載の DNA の塩基配列を有する DNA。
7. 請求の範囲第 3～6 項のいずれかに記載の DNA を用いて、増殖しているインスリン産生細胞を検出する方法。
- 20 8. 請求の範囲第 3～6 項のいずれかに記載の DNA を組み込んだベクターより得られる形質転換体。
- 25 9. 請求の範囲第 3～6 項のいずれかに記載の DNA を、胚性幹細胞または間葉系幹細胞を含む初代培養細胞または樹立細胞株に導入して胚性幹細胞または間葉系幹細胞を分化させる方法。
10. 請求の範囲第 3～6 項のいずれかに記載の DNA を、胚性幹細胞または間

WO 03/078631

PCT/JP03/02620

1/3

図 1

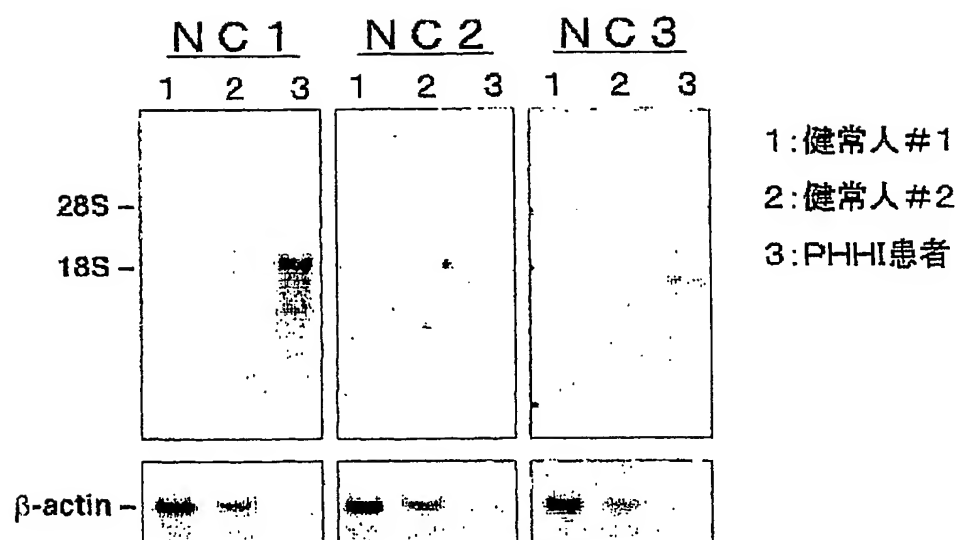
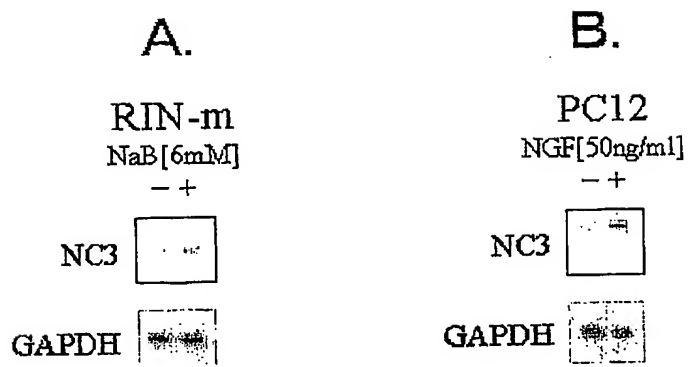


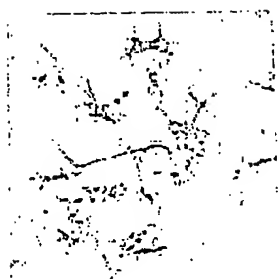
図 2





3/3

図 3



NC1



null

1/12

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; 鐘淵化学工業株式会社 KANEKA CORPORATION

&lt;120&gt; 新規遺伝子

&lt;130&gt; T725. TEMNC-1

&lt;150&gt; JP P2002-071592

&lt;151&gt; 2002-03-15

&lt;160&gt; 6

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 247

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; NC1

&lt;400&gt; 1

Met Gln Val Val Lys Glu Gln Val Met Arg Ala Leu Thr Thr Lys Pro

1

5

10

15

Ser Ser Leu Asp Gln Phe Lys Ser Lys Leu Gln Asn Leu Ser Tyr Thr

20

25

30

Glu Ile Leu Lys Ile Arg Gln Ser Glu Arg Met Asn Gln Glu Asp Phe

35

40

45

Gln Ser Arg Pro Ile Leu Glu Leu Lys Glu Lys Ile Gln Pro Glu Ile

2/12

50                      55                      60  
 Leu Glu Leu Ile Lys Glu Glu Arg Leu Asn Arg Leu Val Glu Gly Thr  
 65                      70                      75                      80  
 Cys Phe Arg Lys Leu Asn Ala Arg Arg Arg Gln Asu Lys Phe Trp Tyr  
                     85                      90                      95  
 Cys Arg Lys Ser Pro Asn His Lys Val Leu His Tyr Gly Asu Leu Glu  
                     100                      105                      110  
 Glu Ser Pro Gln Gly Glu Val Pro His Asu Ser Leu Gln Asu Lys Leu  
                     115                      120                      125  
 Pro Val Ala Asu Ile Lys Ala Val Val Thr Gly Lys Asu Cys Pro His  
                     130                      135                      140  
 Met Lys Glu Lys Gly Ala Leu Lys Gln Asn Lys Glu Val Leu Glu Leu  
 145                      150                      155                      160  
 Ala Phe Ser Ile Leu Tyr Asu Ser Asn Cys Gln Leu Asn Phe Ile Ala  
                     165                      170                      175  
 Pro Asu Lys His Glu Tyr Cys Ile Trp Thr Asu Gly Leu Asn Ala Leu  
                     180                      185                      190  
 Leu Gly Lys Asu Met Met Ser Asu Leu Thr Arg Asn Asu Leu Asu Thr  
                     195                      200                      205  
 Leu Leu Ser Met Glu Ile Lys Leu Arg Leu Leu Asu Leu Glu Asn Ile  
                     210                      215                      220  
 Gln Ile Pro Asu Ala Pro Pro Pro Ile Pro Lys Glu Pro Ser Asn Tyr  
 225                      230                      235                      240  
 Asp Phe Val Tyr Asu Cys Asn  
                     245

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 679

&lt;212&gt; PRT

3/12

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; NC2

&lt;400&gt; 2

Met Asp Arg Val Thr Arg Tyr Pro Ile Leu Gly Ile Pro Gln Ala His  
 1 5 10 15  
 Arg Gly Thr Gly Leu Val Leu Asp Gly Asp Thr Ser Tyr Thr Tyr His  
 20 25 30  
 Leu Val Cys Met Gly Pro Glu Ala Ser Gly Trp Gly Gln Asp Glu Pro  
 35 40 45  
 Gln Thr Trp Pro Thr Asp His Arg Ala Gln Gln Gly Val Gln Arg Gln  
 50 55 60  
 Gly Val Ser Tyr Ser Val His Ala Tyr Thr Gly Gln Pro Ser Pro Arg  
 65 70 75 80  
 Gly Leu His Ser Glu Asn Arg Glu Asp Glu Gly Trp Gln Val Tyr Arg  
 85 90 95  
 Leu Gly Ala Arg Asp Ala His Gln Gly Arg Pro Thr Trp Ala Leu Arg  
 100 105 110  
 Pro Glu Asp Gly Glu Asp Lys Glu Met Lys Thr Tyr Arg Leu Asp Ala  
 115 120 125  
 Gly Asp Ala Asp Pro Arg Arg Leu Cys Asp Leu Glu Arg Glu Arg Trp  
 130 135 140  
 Ala Val Ile Gln Gly Gln Ala Val Arg Lys Ser Ser Thr Val Ala Thr  
 145 150 155 160  
 Leu Gln Gly Thr Pro Asp His Gly Asp Pro Arg Thr Pro Gly Pro Pro  
 165 170 175  
 Arg Ser Thr Pro Leu Asp Asp Asn Val Val Asp Arg Glu Gln Ile Asp

4/12

180	185	190	
Phe Leu Ala Ala Arg Gln Gln	Phe Leu Ser Leu Glu Gln Ala Asn Lys		
195	200	205	
Gly Ala Pro His Ser Ser Pro Ala Arg Gly Thr Pro Ala Gly Thr Thr			
210	215	220	
Pro Gly Ala Ser Gln Ala Pro Lys Ala Phe Asn Lys Pro His Leu Ala			
225	230	235	240
Asn Gly His Val Val Pro Ile Lys Pro Gln Val Lys Gly Val Val Arg			
245	250	255	
Glu Glu Asn Lys Val Arg Ala Val Pro Thr Trp Ala Ser Val Gln Val			
260	265	270	
Val Asp Asp Pro Gly Ser Leu Ala Ser Val Glu Ser Pro Gly Thr Pro			
275	280	285	
Lys Glu Thr Pro Ile Glu Arg Glu Ile Arg Leu Ala Gln Glu Arg Glu			
290	295	300	
Ala Asp Leu Arg Asp Gln Arg Gly Leu Arg Gln Ala Thr Asp His Gln			
305	310	315	320
Glu Leu Val Glu Ile Pro Thr Arg Pro Leu Leu Thr Lys Leu Ser Leu			
325	330	335	
Ile Thr Ala Pro Arg Arg Glu Arg Gly Arg Pro Ser Lys Tyr Val Gln			
340	345	350	
Arg Asp Ile Val Gln Glu Thr Gln Arg Glu Glu Asp His Arg Arg Glu			
355	360	365	
Gly Lys His Val Gly Arg Ala Ser Thr Pro Asp Trp Val Ser Glu Gly			
370	375	380	
Pro Gln Pro Gly Leu Arg Arg Ala Leu Ser Ser Asp Ser Ile Leu Ser			
385	390	395	400
Pro Ala Pro Asp Ala Arg Ala Ala Asp Pro Ala Pro Glu Val Arg Lys			
405	410	415	

5/12

Val Asn Arg Ile Pro Pro Asp Ala Tyr Gln Pro Tyr Leu Ser Pro Gly  
420 425 430

Thr Pro Gln Leu Glu Phe Ser Ala Phe Gly Ala Phe Gly Lys Pro Ser  
435 440 445

Ser Leu Ser Thr Ala Glu Ala Lys Ala Ala Thr Ser Pro Lys Ala Thr  
450 455 460

Met Ser Pro Arg His Leu Ser Glu Ser Ser Gly Lys Pro Leu Ser Thr  
465 470 475 480

Lys Gln Glu Ala Ser Lys Pro Pro Arg Gly Cys Pro Gln Ala Asn Arg  
485 490 495

Gly Val Val Arg Trp Glu Tyr Phe Arg Leu Arg Pro Leu Arg Phe Arg  
500 505 510

Ala Pro Asp Glu Pro Gln Gln Ala Gln Val Pro His Val Trp Gly Trp  
515 520 525

Glu Val Ala Gly Ala Pro Ala Leu Arg Leu Gln Lys Ser Gln Ser Ser  
530 535 540

Asp Leu Leu Glu Arg Glu Arg Glu Ser Val Leu Arg Arg Glu Gln Glu  
545 550 555 560

Val Ala Glu Glu Arg Arg Asn Ala Leu Phe Pro Glu Val Phe Ser Pro  
565 570 575

Thr Pro Asp Glu Asn Ser Asp Gln Asn Ser Arg Ser Ser Ser Gln Ala  
580 585 590

Ser Gly Ile Thr Gly Ser Tyr Ser Val Ser Glu Ser Pro Phe Phe Ser  
595 600 605

Pro Ile His Leu His Ser Asn Val Ala Trp Thr Val Glu Asp Pro Val  
610 615 620

Asp Ser Ala Pro Pro Gly Gln Arg Lys Lys Asp Gln Trp Tyr Ala Gly  
625 630 635 640

Ile Asn Pro Ser Asp Gly Ile Asn Ser Glu Val Leu Glu Ala Ile Arg

6/12

645 650 655  
 Val Thr Arg His Lys Asn Ala Met Ala Glu Arg Trp Glu Ser Arg Ile  
 660 665 670  
 Tyr Ala Ser Glu Glu Asp Asp  
 675

&lt;210&gt; 3

&lt;223&gt; 119

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; NC3

&lt;400&gt; 3

Met Ala Asp Gly Leu Phe Arg Arg Arg Pro Trp Gly Leu Glu Gln Ile  
 1 5 10 15  
 Arg Pro Asp Pro Glu Ser Glu Gly Leu Phe Asp Lys Pro Pro Pro Glu  
 20 25 30  
 Asp Pro Pro Ala Ala Arg Gly Pro Arg Ser Ala Ser Ala Ala Gly Lys  
 35 40 45  
 Lys Ala Gly Arg Arg Ala Gly Gly Arg Ala Gln Gly Gly Arg Ala Gly  
 50 55 60  
 Gln Pro Pro Lys Ala Ala Ser Arg Pro Pro Pro Lys Lys Glu Ala Pro  
 65 70 75 80  
 Pro Leu Asp Glu Gly Cys Tyr Leu Asp His Phe Pro His Leu Ser Ile  
 85 90 95  
 Phe Ile Tyr Ala Ala Ile Ala Phe Ser Ile Thr Ser Cys Ile Phe Thr

7/12

100

105

110

Tyr Ile His Leu Gln Leu Ala

115

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 2109

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (174)... (904)

&lt;223&gt; NC1

&lt;400&gt; 4

```
atgttcacat ggctcaactg gaaacctgtt tcatgaacaa gcttactcag gaaccatctg 60
gtggattatcc agcacattgt tcttcagggg gacgactcta agtcgctttg tgggtggcagc 120
agcttagaat cagtatttgt ggttgggaaa gatggactta cgggagcttg gtaatgcagg 180
tgggtgaagga gcaggttatg agagcactta caaccaagcc tagctccctg gaccagttca 240
agagcaaaact gcagaacctg agctacactg agatcctgaa aatccgccag tccgagagga 300
tgaaccagga agatttccag tcccgcccga ttttgggaact aaaggagaag attcagccag 360
aaatcttaga gctgatcaaa cagcaacgcc tgaaccgcct tgttgaaggg acctgcttta 420
ggaaactcaa tgcccgccgg aggcaagaca agttttggta ttgtcggtt tcgccaatc 480
acaaagtcct gcattacgga gacttagaag agagtcctca gggagaagtg cccacagatt 540
ccttgagga caaactgccg gtggcagata tcaaagccgt ggtgacggga aaggactgcc 600
ctcatatgaa agagaaaggt gcccttaaac aaaacaagga ggtgcttgaa ctgcctttct 660
ccatcttgta tgactcaaac tgccaactga acttcatcgc tccgtgacaag catgagtact 720
gtatctggac agatggactg aatgcgctac tcgggaagga catgatgagc gacctgacgc 780
```



8/12

ggaatgacct ggacaccctg ctcagcatgg aaatcaagct ccgcctcctg gacctggaaa 840  
acatccagat ccctgacgca cctccgccga ttccaagga gccagcaac tatgacttcg 900  
tctatgactg taactgaagt ggccggggcc agacatgccc cttccaaaac tggaacacct 960  
agctaacagg agagaggaat gaaaacacac ccacgccttg gaaccgtcct ttggtaaagg 1020  
gaagctgtgg gtccacattc ccttcagcat cacctctagc cctggcaact ttcagccctt 1080  
agctggcatc ttgctcacgc ccctgattct gttcctcggc tccactgctt caggtcactt 1140  
cccatggctg cagtccactg gtgggacaag agcaaagccc actgccagta agaaggccaa 1200  
agggcccttc catcctagcc ctctgcaggc atgcccttc ttccttggg caggaaagcc 1260  
agcagcccca gactgcccaa aaacttgccc accagaccaa gggcagtgcc ccaaggcccc 1320  
tgtctggagg aaatggccta gctatttgat gagaagacca aacccacat cctcctttcc 1380  
cctctcteta gaatcatctc gcaccaccag ttacacttga attagatct gcgtcaaat 1440  
ctctccccc cttctctcct gcttttgctt tgctctgttc ctctttggtc ccaagagcag 1500  
cagccgcagc ctctctgtga tctccttag cataaatttc ccaaacagtc cacaggtccc 1560  
atgccactt tggctctgca ctgtgatcgt gacaaatctt cctcctcac cagctagtct 1620  
ggggtttcct ctccctgccc caggccagaa ctgccttctt catttccacc cagctccca 1680  
gcctcttagc tgaaagcaca aatggtgaaa tcagtagtct cgctccatct ctaatagact 1740  
aaacctaaat gcctctagga cggactgttg ctatccaagc gtttggtgtt accttctcct 1800  
gggaggtcct gotgcaactc aagttccaca ggatggtcaa gctgtcagac atccaagttt 1860  
acatcattgt aattattact ggtatttaca atttgcaga gttttgggtt agtttttttt 1920  
tttttttttt tgctttgttt ttgtacaaa gagtctaaca ttttttgcca aacagatata 1980  
tatttaatga aaagaagaga tacataaatg tgtgaatttc cagttttttt ttttaattatt 2040  
ttaatcccaa acatcttctt gaaaataaca ttcccttaaa catgctgttg aataaaatgg 2100  
attgtgatg 2109

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 2846

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

9/12

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (79)... (2115)

&lt;223&gt; NC2

&lt;400&gt; 5

tttccttctc ctccctcagt aagcccagag gtctccaccc cacgggagga aggctgaggc 60  
caagaccccg gaagagatat ggaccgctg accagatacc ccatcctggg catccctcag 120  
gcacaccgtg gcaccggcct ggtgctggat ggagacacca gotacacata ccatctggtg 180  
tgcattggggc ccgaggccag cggctggggc caggatgagc cgcagacatg gccactgac 240  
cacaggggccc agcagggcgt gcagaggcag ggggtgtcct acagcgtgca tgcctacact 300  
ggccagccgt cccacgggg gctccactcg gagaacaggg aggatgaggg ttggcaggtt 360  
taccgcctgg gcgccaggga tgcccaccag ggacgtccaa catgggcact ccgccagag 420  
gacggggagg acaaggagat gaagacctac cgcctggatg ctggggacgc tgacccag 480  
aggctgtgtg acctggagcg ggagcgttg gccgtcatcc agggccaggc agtcaggaag 540  
agcagcaccg tggccacgt ccagggcact cctgaccacg gagaccccag gacccccggc 600  
ccacctcgtt ccacgcccct ggaggagaac gtggttgaca gggagcagat tgacttctg 660  
gcagcgagac agcagttcct gagtctggag caggcgaaca agggggcccc tcatagctcc 720  
ccggccaggg ggaccctgc aggcacaacc ccaggggcca gccaggcccc caaggccttc 780  
aacaagcccc acctggccaa cgggcacgtg gtcccatca agccccaggt gaagggggtg 840  
gtcagggaag agaacaaggt gcgtgctgtg cccacctggg ccagtgtcca agttgtggat 900  
gaccctggct ccttggcctc agtggagtcc ccggggaccc ccaaggagac gccatcgag 960  
cgggagatcc gtctggctca ggagcgtgag gcagacctgc gagagcagag ggggcttcgg 1020  
caggcaaccg accaccagga gctggtggaa atccccacca ggccgtgct gaccaagctg 1080  
agcctgatca cagccccacg gcgggagaga gggcgcccg cctctacgt gcagcgggac 1140  
atagtacagg agacacagcg tgaggaagac caccggcggg agggcctgca cgtgggcgg 1200  
gcgtccacac ccgactgggt ctcgagggt cccagcccg gactccggag agccctcagc 1260  
tcagattcca tcctcagccc ggccccagat gcccgtcgg ccgaccagc tccagaagt 1320  
aggaaggtga accgcatccc acctgatgcc taccagccgt acctgagccc cgggaccccc 1380

10/12

cagctagaat tctcagcctt cggagcattc ggcaagccca gcagtctctc cacagcggag 1440  
gccaaaggctg cgacttcacc aaaggccacg atgtccccga ggcatctctc agaatcctct 1500  
ggaaaaacccc tgagcacaaa gcaagaggca tcgaagcccc ctcggggatg cccgcaagcc 1560  
aacaggggtg tcgtgcggtg ggagtacttc cgcctgcgtc ctctgcggtt cagggcccca 1620  
gacgagcccc agcaggccca agtcccccat gtctggggct gggaggtggc tggggcccct 1680  
gcactgaggc tgcagaagtc ccagtcattt gatctgctgg aaaggagag ggagagtgtc 1740  
ctgcgcggg agcaagaggt ggcagaggag cggagaaatg ctctcttccc agaggtcttc 1800  
tccccaacgc cagatgagaa ctctgaccag aactccagga gctcctcca ggcatccggc 1860  
atcacgggca gttactcggg gtctgagtct ccttcttcca gccccatcca cctacactca 1920  
aacgtggcgt ggacagtga agatccagt gacagtgtc ctccgggca gagaaagaag 1980  
gagcaatggt acgtggcat caacccctcg gacggtatca actcagaggt cctggaagcc 2040  
atacgggtga ccggtcaca gaacgccatg gcagagcgt gggaatccc catctacgcc 2100  
agtgaggagg atgactgagc ctcgggatgg ggcgcccacc ccctgcctg ccctgaccct 2160  
cgtgggaact gccaaagca tcgccaagcc cccaccctag gaaatgggtc ctaggtccag 2220  
gatccaagaa ccacagctca tctgccaaca atcccaccat gggcacattt gggactgttg 2280  
ggtttttcgt ttccgtttct atcttccttt agaaatgttt ctgcctttgg ggtctaaagc 2340  
ttttggggat gaaatgggac ccctgctgat tctttctgct tctaagactt tgccaaatgc 2400  
cctgggtcta agaaagaaag agaccgcgtc ctccactttc aggtgtaatt tgcttcgct 2460  
agtctgaggg cagagggacc ggtcaaagag ggtggcacag atcgagcac cttgaggggc 2520  
tgcggtctg agggaggaga cactcagctc ctccctctga gaagtccaa gctgagaggg 2580  
gagacctgcc ctttccaac cctgggaaac catccagtct gagggaggag gccaaactcc 2640  
cagtctggg ggtccctgtg cagccctcaa acccttcacc ttggtgcacc cagccacacc 2700  
tggtggacac aaagctctca catcgatagg atcccatgag gatggtcccc ttcacctggg 2760  
agaaaagtga cccagtttag gagctggagg ggggtctttg tccccaccc ccaaactgcc 2820  
ctgaaataaa cctggagtga gctgcc 2846

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 1556

&lt;212&gt; DNA

11/12

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (28)... (384)

&lt;223&gt; NC3

&lt;400&gt; 6

```
ctgacccacc taccgcgat cctgcccattg gctgacgggc tctttcggcg cagaccctgg 60
ggtctccagc agattcgccc ggaccccgag tccgaaggcc tgtttgacaa gcctcccccg 120
gaagaccctc ccgctgcccg cgggcccagg tcggcgtcgg ccgcgggcaa gaaggctggt 180
cggcgcgcgg gcgggagggc gcaggggggc cgcgcgggc agccccgaa ggccgcacgc 240
cgccccccgc ccaagaagga ggccctcca ctggacgagg gctgctatct cgaccatttt 300
ccgcacctct ccatcttcat ctacgcagcc atcgcttct ccatcacctc ctgcatcttt 360
acctatatcc atttacagct tgcctgagtg gccagcgcgg gacggggttg gcgcaggacc 420
gagcggggag ggaaaggga aacggggctc ggcattttgt gttttagaac agcgtgcac 480
ccccctcatg tagctttoga tgcttgtttc tttccgtctt tgttgtaact atctttgtct 540
atcagtacga aagtacaaag tagctgccgg caatgaaata ggggtgctgt ttgcacctgc 600
aggttagggg tggaggcgtt tagaattttg ggggtgtgatt gagccccgtt tataattaga 660
atgcccctgg accctacca ctctgtgacg tgggggcacg cgcagggatc ccatcatttt 720
gtgtttgggg agctcagagt gcgccaatc ttggaatctt taagggatga gccagacca 780
gacccgcggc cttctagaga gggtcggca gggagggtcg gcgccttggc ccggggtggg 840
ccggagccct gtgatgctgc atgccccca ggaggagcca gctgtgcccc agagttggcg 900
cggccgagag aggacaagag cgcgcagcag gcgaagctgg agggcgggac tcggttaagt 960
gcgttcgtcg ggggtgctgt ctgcgcccc aggggctccg gctgaccacg actgtgtgtt 1020
tttctgcct tagactttgt tgtcgtgcc cggaggagtc gagactggta cccggaggag 1080
ctgtctcacc aggagaccac gtcctggaag tgtccgggac tcgcgggcgg tgtggctgca 1140
gacccgccg gcacgcaggc ccagagctgg cgcactcctg aggatgagac tctgggggcc 1200
ctagccgggg tccacgggag ggctgtcctt ggggactcta ggatggcttc gttctggccc 1260
```

12/12

ggctcacttc tggagctgtg agaccaaga caaaaggggc tgagggattt ctcattgaca 1320  
agggttcgtg cgggaaaacc acatgatcc> tgggatttgt catcttaaga ctcaaaaggc 1380  
ttaataccag gaaccacctt ggcaagatat tttaccacc gccatctct gtttactcat 1440  
gaatgttaaa tgttaaaacg cagcgtcta accctgcata ttatttactt gcaaagtct 1500  
gtaatctgta attgtgatgc ctctgatgga ataaattatc ttttccagtc tcctct 1556

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/02620

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/12, C07K14/47, C12Q1/68, C12N1/15, C12N1/19,  
C12N1/21, C12N5/10, C07K16/18

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/12, C07K14/47, C12Q1/68, C12N1/15, C12N1/19,  
C12N1/21, C12N5/10, C07K16/18

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
DDBJ, GenBank, EMBL, PDB, GeneSeq, SwissProt, PIR, BIOSIS (STN),  
MEDLINE (STN), WPIDS (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98/44159 A1 (ABBOTT LABORATORIES), 08 October, 1998 (08.10.98), Sequence Nos. 27, 42 & EP 973944 A1 & JP 2001-522238 A	1-3, 6, 8, 14
X	WO 02/12262 A1 (GENE LOGIC, INC.), 14 February, 2002 (14.02.02), Sequence No. 1 & AU 200183152 A	1-3, 6, 8, 14
A	WO 95/28411 A1 (BAYLOR COLLEGE MEDICINE), 26 October, 1995 (26.10.95), & EP 789705 A1 & JP 9-512166 A & US 5863724 A	1-14

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
06 May, 2003 (06.05.03)

Date of mailing of the international search report  
20 May, 2003 (20.05.03)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/02620

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 15-19

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 15 to 19 are relevant to diagnostic methods to be practiced on the human body and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. C1 <sup>7</sup> C12N15/12, C07K14/47, C12Q1/68, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C07K16/18		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. C1 <sup>7</sup> C12N15/12, C07K14/47, C12Q1/68, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C07K16/18		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) DDBJ, GenBank, EMBL, PDB, GeneSeq, SwissProt, PIR, BIOSIS (STN), MEDLINE (STN), WPIDS (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 98/44159 A1 (ABBOTT LABORATORIES) 1998. 10. 08、配列番号 27, 42 & EP 973944 A1 & JP 2001-522238 A	1-3, 6, 8, 14
X	WO 02/12262 A1 (GENE LOGIC, INC.) 2002. 02. 14、配列番号 1 & AU 200183152 A	1-3, 6, 8, 14
A	WO 95/28411 A1 (BAYLOR COLLEGE MEDICINE)	1-14
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 06. 05. 03		国際調査報告の発送日 20.05.03
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 植原 克典 電話番号 03-3581-1101 内線 3448



## 第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 15-19 は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。  
つまり、  
請求の範囲15-19は、人体の診断方法に該当し、PCT17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲                      は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲                      は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
	1995. 10. 26 & EP 789705 A1 & JP 9-512166 A & US 5863724 A	

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record.**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☒ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER: \_\_\_\_\_**

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**